

체외배양에서 인간 난포액이 생쥐의 배 발달에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실, 해부학교실*

민부기 · 최기욱 · 김기석 · 이희섭 · 홍기연 · 이봉주 · 이선영 · 박승택*

The Effects of Human Follicular Fluid on Embryonal Development of Mouse in In Vitro Culture

Bu Kie Min, Ki Wook Choi, Kie Suk Kim, Hee Sub Lee, Ki Yeon Hong, Bong Ju Lee, Sun Young Lee and Seung Teak Park*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Anatomy*,
School of Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

= Abstract =

The follicular fluid (FF) of ovary contains various biological active products which affected on the growth of follicles and the fertilization of oocyte in physiological reproductive process of mammals.

This study was designed to determine the effects of human FF on fertilization of oocyte and embryonal development in in vitro culture. The FF was prepared as clear without blood contamination by needle aspiration from mature follicles of human at the time of oocytes retrieval for in vitro fertilization (IVF). As the medium for culture in vitro of embryonal cells, human tubal fluid (HTF) supplemented with follicular fluids at concentrations of 10%, 40% and pure FF were used. These effects were compared to control group of cultured embryos in HTF supplemented with 0.4% BSA (bovine serum albumin). For IVF, 64 eggs in control group, 67 eggs in 10% FF, 57 eggs in 40% FF and 64 eggs in pure FF were respectively allocated. And the rates of fertilization were almost similar in all groups as resulting 82.81% in control, 85.07% in 10% FF, 87.71% in 40% FF and 81.25% in pure FF. On the examination for embryonal cleavage from fertilized eggs, the rates of developing to 4 cell stage was similar in all groups, as results 98.11% in control, 98.27% in 10% FF and 98% in 40% FF but 78.84% in pure FF. And the rates of developing to 8-16 cell stage were significantly reduced as 44% in 40% FF and 44.23% in pure FF ($p < 0.05$) compare to 71.69% in control media. As likewise, the rates of developing to morular stage were also significantly reduced to 36% ($p < 0.05$) and 21.15% ($p < 0.01$) respectively in 40% FF and pure FF. And the rates to blastocystic stage of embryo was lowest as 7.69% in pure FF (Table 1).

The quality of embryonal cells on cleavage to the 8-16 cell stage was poorer, higher concentrations of FF. The rates of grade 1 in pure FF, as 23.07%, was lowest compare to those of other groups, in which the rates of grade 1 in control, 10% FF and 40% FF were 58.49%, 47.36% and 34% respectively. And on the contrary, the rate of grade 4 in pure FF was highest as 23.07%, while those were 5.66% in control, 8.77% in 10% FF and 20% in 40% FF (Table 2).

*본 연구는 원광대학교 교비에 의해 이루어짐.

On the viability of embryos, the rate of embryonal cell death was more rise, at the higher concentrations as well as longer exposure in the follicular fluid. At 48 hours after in vitro culture of embryos, the rate of survival embryos in pure FF was markedly lowered as 44.23%, compare to that of control ($p<0.05$). But there was not significant difference between the rates of survival embryos in each group beside the pure FF, which the rates were 77.35% in control, 70.17% in 10% FF and 60% in 40% FF respectively. And at 72 hours after in vitro culture, the rates of survival embryos were also significantly dropped to 21.15% in pure and 36% in 40% at concentration of FF compare to 62.26% in control ($p<0.05$, $p<0.01$). Finally, the rate of embryonal death at 96 hours after in vitro culture was highest as 82.69% in pure FF among all groups which those were 35.84 in control, 56.14% in 10% FF and 64% in 40% FF respectively (Fig. 1, 2, 3).

In conclusion, this study suggests that the FF has no effects, in particular, to the in vitro fertilization of oocytes but exerted a bad effect to the cleavage, quality and viability of the embryonal cells during in vitro culture. However, the FF is harmful on embryonal development at conditions in higher concentration and especially on the embryos after 8~16 cell stage.

Key Words: Follicular fluid, Human tubal fluid, In vitro culture of embryo, Embryonal development, Embryonal cell quality, Embryo viability

서 론

포유동물의 난을 체외수정과 체외배양하는 과정에서 배양의 조건을 개선시키기 위해 조직세포와 공동배양하거나 배양액에 성장요소, 단백질, 혈청 등을 첨가할 때 배세포에 대해 신진대사를 촉진시킬 뿐만 아니라 영양을 공급하여 난의 고형화 현상을 완화시켜 정자의 침투력이 용이하여 수정을 촉진시키고, 배세포의 분할, 발달을 향상시킨다. 포유동물에서 난소의 난포속에 들어있는 난포액은 체액의 일종으로 여러 성장요소, 호르몬, 단백질 등을 함유하며 이러한 성분들은 난포기에서 난세포의 감수분열을 재개시키고 난세포의 핵, 세포형질들을 성숙시켜서 수정, 배세포 분할, 발달에 주요한 영향을 미친다. 성숙난포액 내에 함유된 단백질 성분들은 농도에서 약간 차이가 있지만 세포의 성장에 필요한 알부민이 주성분으로 구성되어 있으므로 혈청내의 단백질 조성성분이 유사하며 또한 β -carotene이 함유되어 있어서 mucopolysaccharide의 생합성에 관여하여 성장물질을 생성하고 항산화 역할로 세포의 보호작용이 있다¹고 한다. Blumenfeld 등²과 Lambert 등³은 난포액을 첨가한 배양액으로 정자를 처리하여 체외에서 난세포와 수정시켰을 때 일반 배양액에 비해 수정률을 증가시켜서 임신성공률을 향상시킨다고

하였다.

생체 생식과정에서 배란이 일어날 때 약간의 난포액은 난세포와 함께 난관으로 유입되어 정자의 선단체 반응 (acrosome reaction)을 자극하여 수정을 활성화한다고^{4~6} 하였으며 또한 생식자 난관 내 이식과정에서 난포액을 배양액으로 사용했을 때 배세포의 발달과 세포의 양질 정도가 양호하여 자궁내 착상률이 높고 자연유산율이 현저히 감소한다⁷고 보고하였으며 Laroca 등⁸과 Kim 등⁹은 소의 난을 난포액에서 체외배양한 후 체외수정률과 수정란의 세포분할이 양호하였다고 하였으며 Hemmings 등¹⁰은 배양액에 10% 성숙난포액을 첨가하여 배세포를 체외에서 배양하였을 때 10% 체대혈청을 첨가한 일반 배양액과 비교하여 배세포 분할이 현저하게 향상되어 상실배와 배포기에 도달하는 비율이 상승하였는데 이러한 결과는 성숙난포액에는 혈청과 달리 배세포 독성물질이 존재하지 않기 때문이라고 보고하였다. 그러나 Dell'Aquila 등¹¹은 말의 난을 난포액에서 체외수정하여 배양한 결과 배의 세포분할과 질적 정도가 불량하여 세포정지와 할구의 분열이 심하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 난포액이 배양액으로서 유용성이 있는지 판정하기 위해 조성 인간난포액과 10%, 40%, 순수농도 등 각각의 인간난포액을 첨가한 배양액에서 생쥐의 난을 체외수정과 체외배양으로 실험하여 수정률, 배세포의 분할, 질적

정도 및 배의 생존 등을 비교 관찰하였다.

연구재료 및 방법

1. 인간난포액의 처리

체외수정 과정에서 난소의 과배란을 자극하여 hCG를 투여한 후 34시간에서 난세포 회수과정에서 직경이 18 mm 이상 크기의 인간 난포로부터 혈액이 혼탁되지 않은 상태로 난포액을 흡입하였다. 흡입한 난포액을 원추형 시험관에 넣고 1000 xg에서 10분 동안 원심분리한 후 상층부를 취하여 56℃ 수조에서 30분간 열 비동화시켰다. 그리고 열 비동화된 난포액을 0.2 µm microfilter로 여과하여 체외배양액으로 사용하기 위해 영하 20℃에 보관하였다.

2. 난자 회수와 체외수정

10주령의 B6C3F1종의 암컷 생쥐에게 PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin)의 5 IU를 복강내 주사하고 48시간이 경과한 후 HCG (human chorionic gonadotrophin) 5 IU를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. HCG를 투여한 후 15시간이 경과하여 생쥐의 경추를 탈골하여 희생시킨 후 미세 수술기구로 개복하고 비대해진 난관 팽대부를 절개하여 난자들을 회수하였다.

회수한 난자들은 0.4% BSA (bovine serum albumin)를 첨가한 인간난관액과 10%, 40%의 농도로 난포액을 첨가한 인간난관액과 순수난포액 등 각각 할당된 배양액에서 세척한 후 30x30x10 mm 조직 배양접시 (Falcon) 위에 10%, 40% 농도의 난포액을 첨가 배양액, 순수난포액과 0.4% BSA난관액으로 300 µl씩 소적한 각각의 할당된 배양액으로 옮겨 파라핀 oil로 씌운 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다.

한편 10주령의 B6C3F1종 수컷 생쥐를 희생시킨 후 개복하여 정소 미부를 절제하고 정소를 압착하면서 정액을 채취하였다. 채취한 정액을 10%, 40% 농도의 난포액 첨가 배양액, 순수난포액과 0.4% BSA난관액의 각각의 할당 배양액으로 300 µl씩 소적한 배양접시로 옮겨 파라핀 oil로 덮은 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 보육한 후 난자가 있는 각각의 배양접시의 소적 배양액내로 주입하여 체외수정을 시도하였다. 체외수정 15시간이 경과한 후 수정을 확인하고 수정난들은 배포기에 이르는 과정까지 96시간 동안 계속적으로

배양하였다.

3. 실험계획

회수한 생쥐 난들을 실험군과 비교군으로 나누어 비교군의 0.4% BSA난관액에 64개, 실험군으로 10% 난포액 첨가 난관액에 67개, 40% 난포액 첨가 난관액에 57개, 순수난포액은 64개를 각각 할당하여 2차에 걸쳐 실험하였다. 실험과정은 각각 할당된 배양액에서 체외수정을 시도한 후 96시간 동안 체외배양하면서 배세포의 분할, 세포의 양질 정도, 배의 생존 등을 관찰하여 비교 분석하였다. 배의 양질을 분석하기 위해 역상현미경으로 200배 확대하여 할구세포의 형태를 관찰하였고 Salha 등¹²이 발표한 등급을 이용하여 grade 1: 세포 크기가 균등, 세포막 분절이 10% 이하, grade 2: 세포 크기가 불균등, 세포막 분절이 20% 이상, grade 3: 세포 크기의 불균등, 현저한 세포막 분절, grade 4: 고도의 세포막 분절 또는 세포질 과립의 출현 등으로 분류하여 판정하였다.

세포정지는 세포분할이 12시간 경과 후에 더 이상 진행되지 않는 경우, 세포사는 세포정지 후 12시간이 경과한 경우 또는 고도의 세포막 분절이 나타나거나 세포질에 흑색 과립현상이 나타난 경우로 간주하였다.

4. 통계분석

실험결과들의 통계적 신빙도를 판정하기 위해 Student t-test를 이용하여 $p > 0.01$, $p > 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

회수한 생쥐 난들을 각각의 할당된 배양액에서 체외수정을 시도하였으며 수정률은 0.4% BSA난관액에서 82.81%, 10%, 40% 난포액 첨가 배양액과 순수난포액은 각각 85.07%, 87.71%, 81.25%로서 모든 군에서 거의 비슷한 비율을 나타냈다. 한편 각각의 배양군에서 수정난을 배양하여 배세포의 분할을 관찰하였는데 4세포기에 도달하는 비율은 0.4% BSA난관액, 10%, 40% 난포액 첨가 배양액에서 각각 98.11%, 98.27%, 98%로서 거의 동일하였으나 순수난포액에서는 78.84%로 다른군에 비해 저하되었다. 8~16세포기의 분할율은 0.4% BSA난관액과 10% 난포액에서는 71.69%, 63.15%로서 별다른 차이를 나타내지 않았는데 40% 난

Table 1. The effects of follicular fluid in various concentrations on the cell cleavage of embryonal development during 96 hours of incubation.

Medium embryo cleav.	0.4% HTF Em/O (%)	10% FF Em/O (%)	40% FF Em/O (%)	Pure FF Em/O (%)
Fertilization	53/64 (82.81)	57/67 (85.07)	50/57 (87.71)	52/64 (81.25)
<4 cells	52/53 (98.11)	56/57 (98.27)	49/50 (98.00)	41/52 (78.84)
<8~16 cells	38/53 (71.69)	36/57 (63.15)	22/50 (44.00)†	33/52 (44.23)
Morula	31/53 (62.26)	32/57 (56.14)	18/50 (36.00)†	11/52 (21.15)‡
Blastocyst	13/53 (24.52)	12/57 (21.50)	6/50 (12.00)	4/51 (7.69)

Em; embryos, O; oocytes

†; p<0.05 vs control of 0.4% BSA HTF, ‡; p<0.01 vs control of 0.4% BSA HTF

Table 2. The effects of follicular fluids in various concentration and human tubal fluid on the cell quality at the 8~16 cell stage of embryonal development

Medium cell grade	0.4% HTF Em/Fe. egg (%)	10% FF Em/Fe. egg (%)	40% FF Em/Fe. egg (%)	Pure FF Em/Fe. egg (%)
Grade 1	31/53 (58.49)	27/57 (47.36)	17/50 (34.00)	12/52 (23.07)
Grade 2	7/53 (13.20)	11/57 (19.29)	5/50 (10.00)	11/52 (21.15)
Grade 3	12/53 (22.64)	14/57 (24.56)	18/50 (36.00)	17/52 (32.69)
Grade 4	3/53 (5.66)	5/57 (8.77)	10/50 (20.00)	12/52 (23.07)

Em; Embryos, Fe. egg; Fertilized egg

포액에서 44%로 0.4% BSA난관액과 비교하여 현저한 감소를 나타내어 유의한 차이를 보였고 (p<0.05), 순수난포액에서도 44.23%로 저하되었다. 상실배에 도달한 비율은 0.4% BSA난관액과 10% 난포액에서 62.26%, 56.14%인데 40% 난포액과 순수난포액에서 36%와 21.15%로서 역시 현저히 감소하여 유의한 차이를 나타냈으며 (p<0.05, p<0.01) 배포기까지 발달하는 비율은 난포액의 농도가 높을수록 저조하여 순수난포액에서 7.69%로 다른 배양군에 비해 가장 낮았다 (Table 1).

난포액이 배세포의 질적 정도에 미치는 영향을 알아내기 위해 배 발달의 16세포기까지 분할과정에서 세포의 형태를 관찰하였는데 0.4% BSA난관액의 비교군에서 grade 1과 grade 4의 세포 비율은 각각 58.49%, 5.68%이었는데 배양액내에 난포액의 농도가 높을수록 배세포의 양질 정도가 불량하여 순수난포액에서 grade 1의 비율은 23.07%로 가장 낮은 반면 grade 4의 비율은 23.07%로 다른 배양군과 비교하여 가장 높았다 (Table 2).

배세포에 대한 난포액의 독성 여부를 규명하기

위해 각각의 배양액에서 수정란을 체외배양하는 과정에서 배세포 생존, 세포정지, 세포사를 관찰하였는데 배세포 배양의 48시간이 경과한 후 생존 세포의 비율은 0.4% BSA난관액, 10%, 40% 난포액의 첨가난관액에서 각각 77.35%, 70.17%, 60%로서 각 배양군 사이에 유의한 차이가 없었으나 순수난포액에서 44.23%로 0.4% BSA난관액에 비해 현저히 감소하였으며 (p<0.05) 반대로 세포사의 비율은 다른군에 비해 훨씬 증가하였다 (Fig. 1). 또한 체외배양의 72시간에서 배세포의 생존율은 비교군에서 62.26%이었고 40% 난포액에서는 36%로 현저한 감소를 나타냈으며 (p<0.05) 순수난포액에서는 21.15%로 배세포의 생존율이 현저하게 저하되었다 (p<0.01). 배의 세포사는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나 난포액의 농도가 높을수록 점차 증가하였으며 배세포를 96시간 이상 배양하는 경우 순수난포액에서의 배의 생존율은 더욱 낮았고 반대로 배의 세포사는 다른 여러 군에 비해 매우 낮았다 (Fig. 2, 3).

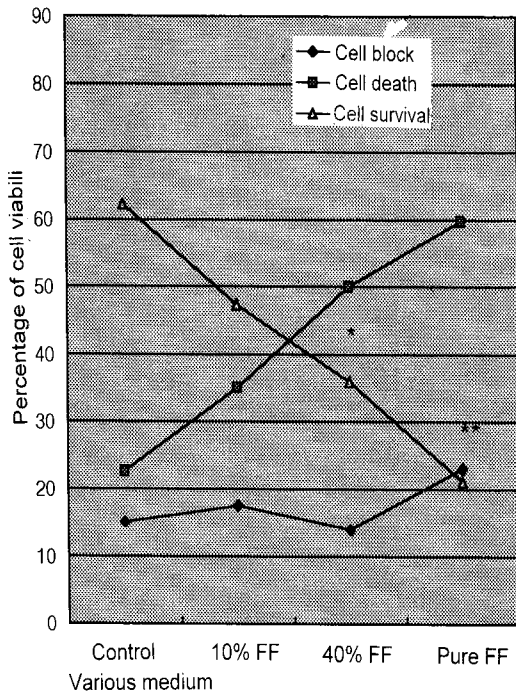


Fig. 1. The effects of FF in different concentrations on the cell viability at 48 hours after in vitro culture of embryos. * $p < 0.05$

고찰

난포액에는 여러 성장요소, hormone, 단백질성분들을 함유하므로 체외배양에서 배양액에 난포액을 첨가할 때 난세포의 감수분열과 수정란의 분할을 자극한다^{13,14}고 한다. Hemmings 등¹⁰에 의하면 난포액내에 insulin like growth factor (IGF), transforming growth factor, platelet derived growth factor 등 성장요소들을 함유하고 있으며 IGF-1은 성장요소의 작용을 조절하는 역할이 있어서¹⁵ IGF-1의 결합 단백능을 증가시켜서 성장요소의 생성을 증가시키므로 배세포를 체외배양하는 과정에서 난포액을 첨가할 때 배 발달을 현저하게 향상시킨다고 보고했다. 또한 난포액은 정자의 운동성을 활성화시키고 선단체 반응을 촉진한다^{4~6}고 하였으나 반대로 Funahashi 등¹⁶은 25% 성숙난포액을 첨가한 배양액에서 정자를 처리했을 때 난세포의 투명대 결합력을 억제하여 수정률이 감소되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 각각 10%, 40%, 순수난포액으로 정자를 처리하였을 때

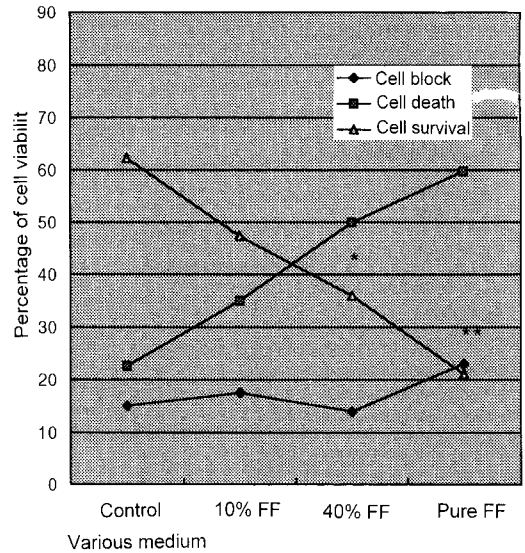


Fig. 2. The effects of FF in different concentrations on the cell viability at 72 hours after in vitro culture of embryos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

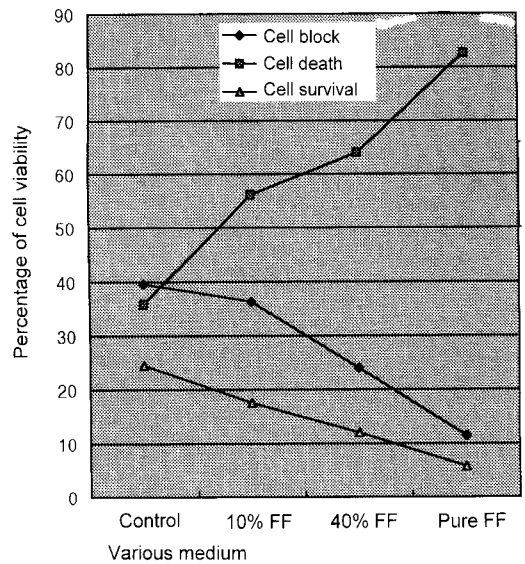


Fig. 3. The effects of FF in different concentrations on the cell viability at 96 hours after in vitro culture of embryos.

운동성과 체외수정률에 특별한 영향을 미치지 않았으며 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

난포액내에 함유된 대부분의 단백질성분은 혈청에서 유래되며 난포의 주위에 혈관 분포가 양호

할수록 난포액의 단백질은 혈청 단백질과 비슷한 농도에 도달할 수 있다¹⁷고 한다. 배세포의 배양에서 영양을 공급하는데 필요한 단백질 성분은 주로 albumin이며 미성숙 난포에 비해 성숙난포에는 albumin의 농도가 높아서 성숙난포액을 배양액에 첨가할 때 배세포에 대해 유익하다¹⁰고 하였다. 그러나 Bayer 등¹과 Hemmings 등¹⁰은 성숙한 난포들로부터 흡입한 난포액에서 분광 흡광도가 450 nm 이상인 난포액들을 분석하여 단백질 성분의 농도가 각기 현저한 차이가 있었으며 단백질 성분의 분자량에서도 각각 차이를 나타내어 17,000 Da. 이하의 저분자량을 포함하는 난포액은 배세포 독성을 나타내어 배세포의 분할을 억제하고 할구세포 분열을 일으켜 배세포가 상실배 또는 배포기에 도달하지 못하였으며 난포액이 함유하는 여러 단백질 성분은 배세포의 발달에 대해 albumin 보다 유용하지 못하다고 하였다. 또한 Romero 등¹⁸은 난포액 내에는 purine, adenosine, hypoxanthine 등 단백질 성분이 배세포의 성장에 억제요소로 작용하여 배의 세포분할을 저해한다고 하였으며 Serta 등¹⁴은 10% 난포액을 첨가한 배양액에서 배세포를 배양하여 양호한 결과를 얻지 못했다고 보고하였다.

본 연구에서는 10%의 난포액을 첨가한 배양액에서 배세포를 배양했을 때 배세포 분할, 세포의 양질 정도 생존세포 등이 0.4% 조성 인간난관액에서 배양결과와 비교하여 배 발달에 별다른 영향을 주지 않았으며 배세포 독성은 나타내지 않았다. 그러나 40%를 첨가한 배양액과 순수난포액에서 48 시간 이상 배양한 배들은 세포의 질적 불량, 세포 정지 또는 세포괴사 등을 현저하게 일으켜 난포액이 배세포에 대해 독성작용을 하는 것으로 나타났다. 일반적으로 배양액의 조성성분이 부적합할 때 일차적으로 세포정지가 일어나고 시간이 경과하여 세포사가 일어난다. 그러나 배양액에 독성 성분이 함유되어 있을 때 세포정지, 세포 질적도의 불량, 세포사가 거의 동시에 일어난다. 본 연구에서 배세포 배양에서 난포액을 첨가한 경우 난포액의 농도가 높을수록, 배양기간이 경과할수록 세포의 질적 정도가 불량하고 세포사가 현저하게 일어나는 것을 관찰하였다.

난포액이 배세포에 미치는 영향에 대해 배세포 보호작용이 있다는 주장⁸⁻¹⁰이 있는 반면 Dell'Aquila 등¹¹은 세포독성이 있을지도 모른다고 보고하였고 Serta¹⁴은 배세포의 분할에 아무런 영향이 없다고 보고하였다. 따라서 아직까지 배 발달에

있어서 난포액의 작용에 관한 견해가 확립되지 않아 논란이 많다. 본 연구에서는 난포액을 여러 농도로 배양액에 첨가하여 실험하였으며 그 결과 난포액이 배 발달을 저해하는 것을 관찰하였다.

성숙난포액에는 고농도의 생물학적 활성물질과 albumin, 면역반응 물질인 interleukin, IGF-1 등 단백질 성분을 함유하며¹⁹ 면역 단백질 성분들은 난포의 성장 발달을 조절하기 위해 activin과 inhibin 등을 생성한다. 성숙난포액에는 고농도의 inhibin을 함유하고 있는데^{20,21} 이러한 억제물질들이 배세포에서 gene이 형성되는 시기에 작용하여 세포 분할을 저해한다²²고 하는데 아직 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다. 따라서 차후에 난포액의 생화학적, 면역학적 물질, 호르몬 등을 분석하여 생물학적 유전학적 등 배 발달의 관련에 대해 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 난포액은 농도에 관계없이 난의 체외수정과 4세포기 이전의 배에 대해 별다른 영향을 미치지 않았으며 40%와 순수농도의 난포액은 8~16세포기 이후에 배세포의 분할을 억제하고 배세포의 질적 정도와 생존율을 현저히 저하시켜 배 발달을 저해하였다. 10% 난포액 첨가 배양액은 배 발달에 거의 독성작용을 나타내지 않았으나 40% 난포액 첨가 배양액과 순수난포액 등 농도가 높을수록 생존 배의 비율은 감소하였고 반대로 배의 세포사가 현저히 증가하여 난포액은 배세포에 대해 독성이 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bayer SR, Ransil BJ, Shelton SJ, Armant DR: Spectrophotometric analysis of follicular fluid related to oocyte fertilization, embryo cleavage, and follicular fluid protein and hormone content. *Fertil Steril* 1990, 54, 606-11.
2. Blumenfeld Z, Nahhas F: Pretreatment of sperm with human follicular fluid for borderline male infertility. *Fertil Steril* 1989, 51(5), 863-3.
3. Lambert H, Steinleitner A, Eisermann J, et al. Enhanced gamete interaction in the sperm penetration assay after coincubation with pentoxifylline and human follicular fluid. *Fertil Steril*

- 1992, 58(6), 1205-8.
4. Mortimer D, Camenzind AR: The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Human Reprod* 1989, 4(2), 169-74.
 5. Siegel MS, Paulson RJ, Graczykowski JW: The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa. *Human Reprod* 1990, 5, 975-80.
 6. De Jonge CJ, Barratt CL, Radwanska R, Cooke ID: The acrosome reaction inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 1993, 14, 359-65.
 7. Hasan F, Ramana V: Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamet transfer medium. *Fertil Steril* 1990, 53, 515-20.
 8. Laroca C, Kmaid S, Calvo J: Effects of follicular fluid and estrous cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte in vitro. *Theriogenol* 1993, 39, 253.
 9. Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K: The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* 1996, 45, 787-99.
 10. Hemmings R, Miron P, Lachapelle MH, Ward L, Falcone T, Guyda H: Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryo. *Fertil Steril* 1994, 62, 1018-21.
 11. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F: Effects of follicular fluid supplementation of in vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1997, 12, 2766-72.
 12. Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L, Lui S, Sharma V: The relationship between follicular aspirate volume and oocyte maturity in in vitro fertilization cycles. *Human Reprod* 1991, 13, 1901-6.
 13. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL: In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum free medium. *Biol Reprod* 1991, 44, 256-60.
 14. Serta RT, Michalopoulos J, Seibel MM, Kiessling AA: The developmental potential of mouse oocytes matured in serum free culture conditions. *Human Reprod* 1995, 10, 1810-5.
 15. Spitzer D, Murach KF, Lottspeich F, Staudach A, Illmensee K: Different proteins patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Human Reprod* 1996, 11, 798-807.
 16. Funahashi H, day BN: Effects of follicular fluid at fertilization on in vitro sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod fertil* 1993, 99, 97-103.
 17. Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferrm N: Proteins of human follicular fluid; the blood follicle barrier. *Fertil Steril* 1973, 24, 429-34.
 18. Romero A, Nauta W, Seidal GE Jr: A meiotic stimulator in bovine follicular fluid is retained in fraction larger than 100,000 daltons. *Theriogenology* 1992, 37, 286.
 19. Giudice LC, Chandrasekher YA, Cataldo NA: The potential roles of intraovarian peptides in normal and abnormal mechanisms of reproductive physiology. *Curr Opin Obst Gynecol* 1993, 5, 350-9.
 20. Andersen CY, Westgaard Lg, Sinosich MJ, Byrskov AG: Human preovulatory follicular fluid: inhibin and free steroids related to optimal follicular maturation in ovarian stimulation regimes and possible function in ovulation. *Human Reprod* 1992, 7, 765-9.
 21. Hiller SG, Miro F: Inhibin, activin, and follistatin: Potential roles in ovarian physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1993, 687, 29-38.
 22. Braude F, Bolton V, Moore S: Human gene expression first occurs between the 4 and 8 cells stage of preimplantation development. *Nature* 1988, 31, 459-61.